



TITLE:

結核に対する生体の防衛力に関する研究: 第6報健康人尿中よりの抗結核菌性ペプチド様物質の単離

AUTHOR(S):

辻, 周介; 大島, 駿作; 藤田, 豊; 岡田, 長保

CITATION:

辻, 周介 ...[et al]. 結核に対する生体の防衛力に関する研究: 第6報健康人尿中よりの抗結核菌性ペプチド様物質の単離. 京都大学結核研究所紀要 1963, 11(2): 111-120

ISSUE DATE:

1963-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/51895>

RIGHT:

結核に対する生体の防衛力に関する研究

第6報 健康人尿中よりの抗結核菌性ペプチド様物質の単離

辻 周 介, 大 島 駿 作

藤 田 豊, 岡 田 長 保

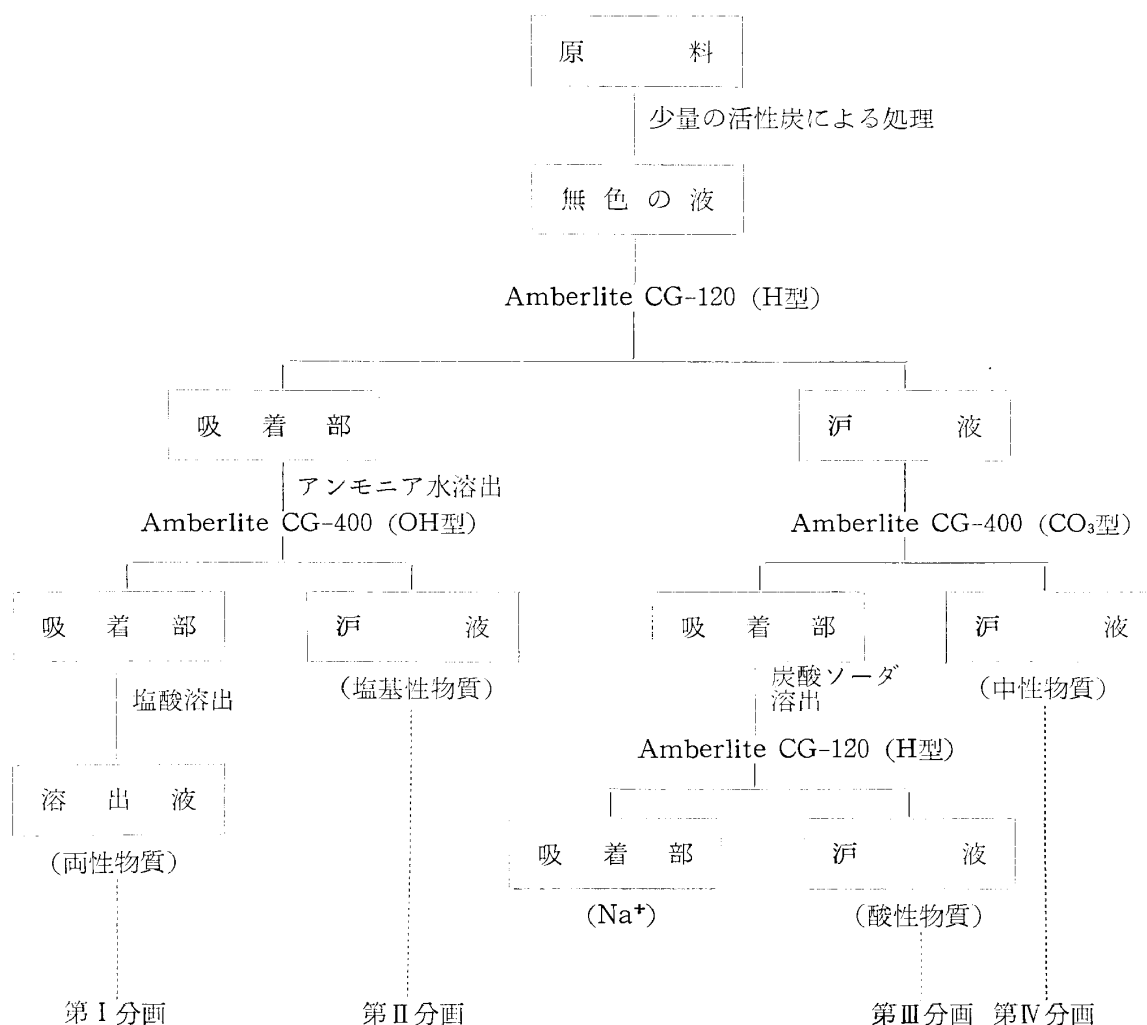
緒 論

結核菌に対して動物の体液の低分子成分が発育抑制的に作用すること, 次いで健康人尿や動物の血清, 筋肉, 肝臓, 腎臓及び肺臓の低分子成分をイオン交換樹脂により系統的に4分画(第I分画: 両性物質, 第II分画: 塩基性物質, 第III分画: 酸性物質, 第IV分画: 中性物質)に分画し, 第I分画及び第III分画に結核菌

発育抑制能の存することを証明したことは既報¹⁾²⁾³⁾の通りである。(第1表)

其後我々は主として人尿を材料として, 之等の低分子抗菌因子の化学的同定を志して実験を行って来たが, 最近第I分画より比較的強力な抗菌作用を有するペプチド様物質と推定される物質を結晶形に単離することに成功したので, ここにその精製操作を報告したい。

第1表 イオン交換樹脂による系統的分画方法



実験材料

既報³⁾の如く、プールした多量の健康人尿をイオン交換樹脂のカラムを組合せて系統的に使用することにより第1表に示す如く第I, 第II, 第III及び第IVの4分画を得た。本実験の材料とした第I分画は両性物質を含む分画で, Amberlite CG-120 (H型) (200~400メツシュ) のカラムの (10×40cm) 吸着部を2規定のアンモニア水で溶出後, 更に Amberlite CG-400 (OH型) (200~400メツシュ) に吸着させ, これを2規定塩酸で溶出することにより得た分画である。

実験方法

活性炭カラムによる精製実験

醋酸活性化した活性炭を用いてカラム (3.5×7cm) を作り, これを Jutisz らの方法⁴⁾を応用し芳香族ペプチド及びアミノ酸と脂肪族ペプチド及びアミノ酸に分別した。即ち活性炭カラムを硫化水素飽和蒸溜水で洗滌した後, 材料 (第I分画) 1.5g を蒸溜水 100cc に溶解して吸着させ, 600cc の硫化水素飽和 5% 醋酸で洗滌した。次に硫化水素飽和醋酸エチル飽和水 200cc で溶出を行った後, 更に 20% 醋酸 200cc を用いて溶出を行った。各洗滌液及び溶出液を夫々減圧下 (10mmHg 以下) に加温 (27~28°C) して濃縮乾固した。

メタノール抽出操作

活性炭カラムにより精製した乾固材料の約 3g に 50cc の純メタノールを加え, 充分攪拌して溶解し, 遠心沈殿 (3000r.p.m. 10分間) を行った後上清部を採集し, これを真空デシケーター中で乾固した。同様操作を3回繰返すことにより上清部は完全にメタノール可溶部のみを含む様になり, 塩類その他の不溶性成分を殆んど取除くことが出来た。第I分画中の抗結核菌性因子がメタノール可溶性であることは既報³⁾の実験成績より明らかである。

イオン交換樹脂による分画

メタノール抽出材料に就て Dowex 50W×8 (Dow Chemical 社製, 200~400メツシュ) によるカラムクロマトグラフィーを行った。カラムの寸法は 2×35cm。約 3g の粗材料を 2cc の蒸溜水に溶解して吸着させた後, 1.5 規定塩酸 2400cc, 4 規定塩酸 600cc 及び 2 規定アンモニア水 100cc を逐次溶媒として試料を溶出し, フラクションコレクター (Technicon 社製) を用いて各試験管に 20cc ずつ溶出液を採集した。

各試験管より 0.5cc ずつの試料を採り, 各々に就て

ニンヒドリン反応を定量的に試験した。対照にはロイシンを使用した。

各試験管に就て Beckman 式分光光度計 (島津製作所製) による紫外線吸光度の測定を行った (波長 265m μ)。

各試験管より 2cc ずつの試料を秤量瓶に別々に採集し, 真空デシケーター中で乾燥, 秤量後, 結核菌発育抑制力を定量的に試験した。

ペーパークロマトグラフィー操作による精製操作

以上の操作により或程度精製した実験材料に就て, 抗結核菌性物質の単離を目的としてペーパークロマトグラフィーによる精製を行った。Whatman No.1 の沨紙 (40×40cm) 一枚につき, 乾固した材料 10mg ずつ各 0.5cc の蒸溜水に溶解したものを, 沨紙の下方に一直線に塗布し, 一次元ペーパークロマトグラフィー (上昇法) の要領で, ブタノール・醋酸・水 (4:2:1) を溶媒としてフロントが約 25cm の高さになる迄 (室温, 約15時間) 展開を行った。

展開後数条の細い沨紙のサンプルを切り取り, ニンヒドリン試験, 紫外線吸収試験及びその他の化学反応に就て試験を行った後, 沨紙上に展開された物質の分布に応じて各物質を単離した。通常この程度迄精製した材料の場合は数個の物質の分布が認められたが, 以上の様な方法で略その数と種類が推定出来るので, 各物質を沨紙上で区別することにはさ程困難を感じなかった。

各物質を沨紙より抽出するには, 先ず沨紙を各物質の分布に応じて単一物質を含む様に水平方向に切って細片とし, 次いで各沨紙片を長さ約 10cm 位に切断し, 蒸溜水による抽出操作を行った。各抽出液を真空デシケーター中で乾固し各物質の粗結晶を得た。

再結晶操作

各粗結晶をメタノール及びアセトンを用い溶解度の差を利用して再結晶操作を行った。

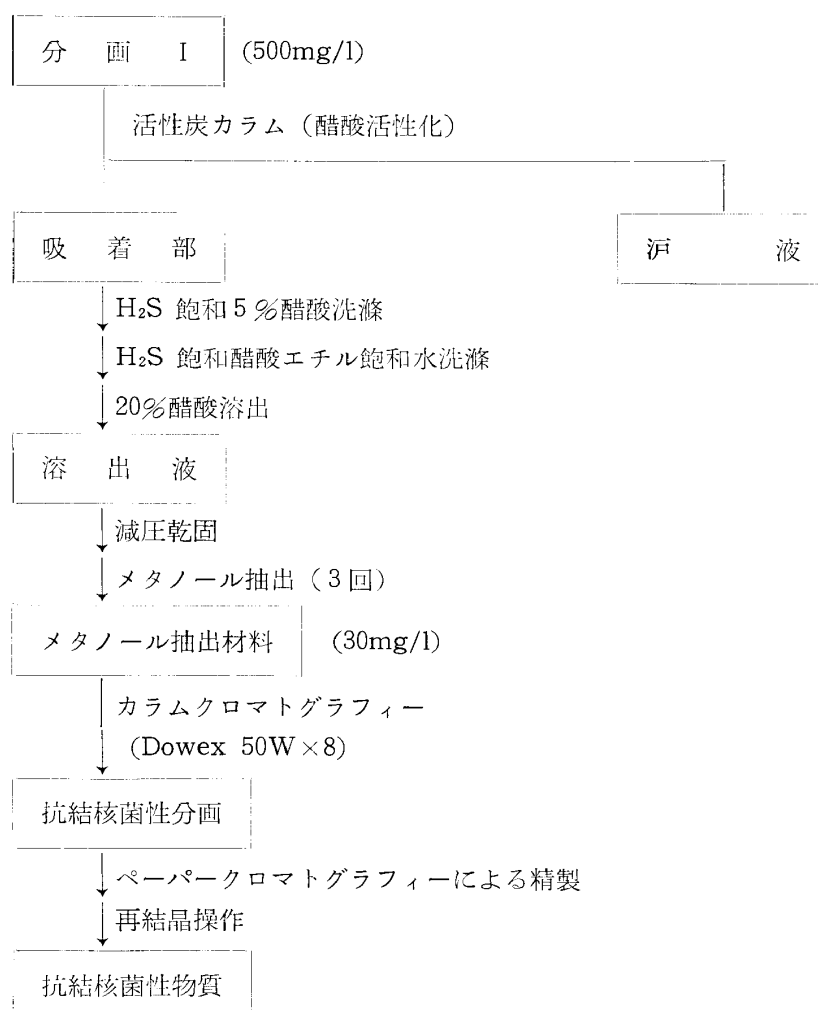
(以上の実験操作を第2表に総括して示す)

結核菌発育抑制実験

上述の各試験材料に就て *in vitro* の結核菌発育抑制作用を定量的に試験した。試験方法は "Slide Culture 法"⁵⁾を用いた。試験菌株としては人型結核菌 H37Rv 株を使用した。

培地は 0.5% 牛血清アルブミン (Armour 社製) 加 kirchner 培地を使用した。培養日数は7日間であった。各試験材料を逐次倍数稀釈した試験管列を作成し, これに上述の培地を等量添加して培養し, 試料の結核菌に対する最低発育阻止濃度を検査した。

第 2 表 分画 I に於ける抗結核菌性物質の精製過程



実 験 成 績

健康人尿の第 I 分画は両性物質を含み、ニンヒドリン反応陽性、Molisch 反応陰性の分画であった。結核菌に対する最低発育阻止濃度は 1 mg/cc であり、原尿 1,000cc より乾燥重量にして約 500mg の第 I 分画を得ることが出来た。

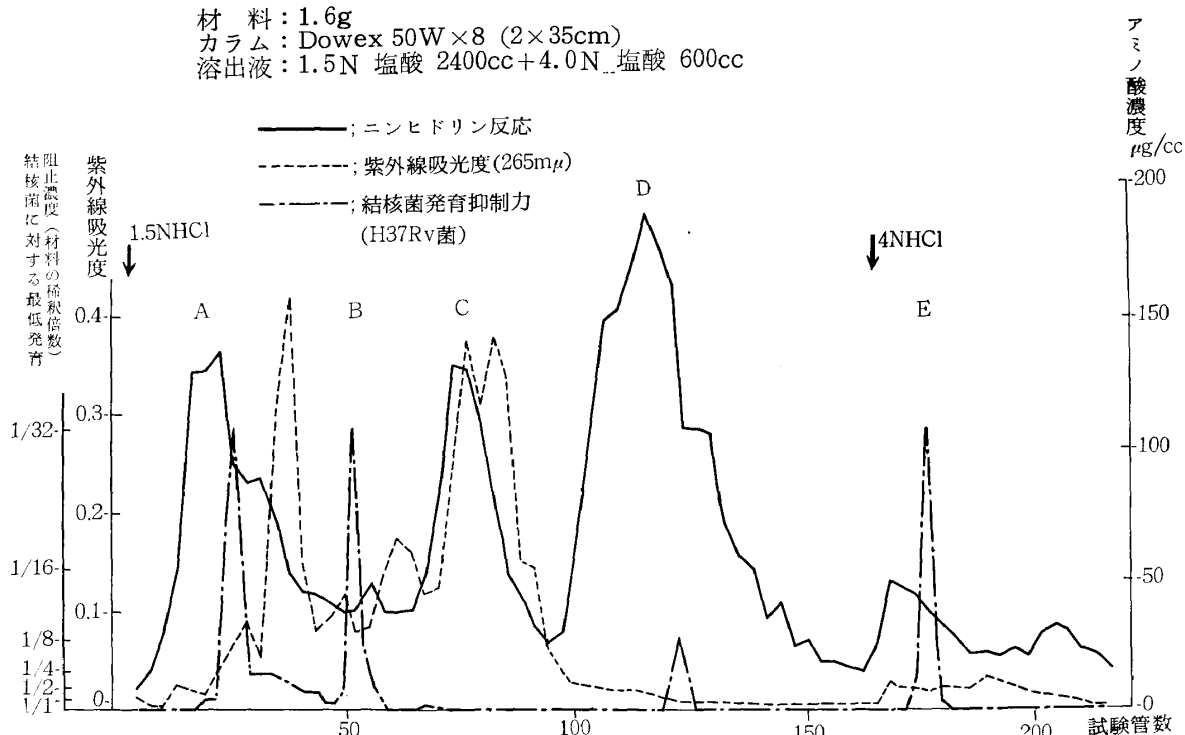
第 I 分画を醋酸活性化した活性炭カラムに吸着させ、硫化水素飽和 5%醋酸洗滌液分画、硫化水素飽和醋酸エチル飽和水による溶出液の分画及び 20%醋酸による溶出液の分画の 3 分画に分画すると、結核菌発育抑制作用は 20%醋酸溶出分画にのみ認められ、他の 2 分画には認められなかった。従って活性因子は活性炭によく吸着される物質であり、恐らくは芳香族ペプチド或はアミノ酸かと推定された。

メタノール抽出操作によってチロシンを含む白色不溶部を除去することが出来た。この不溶

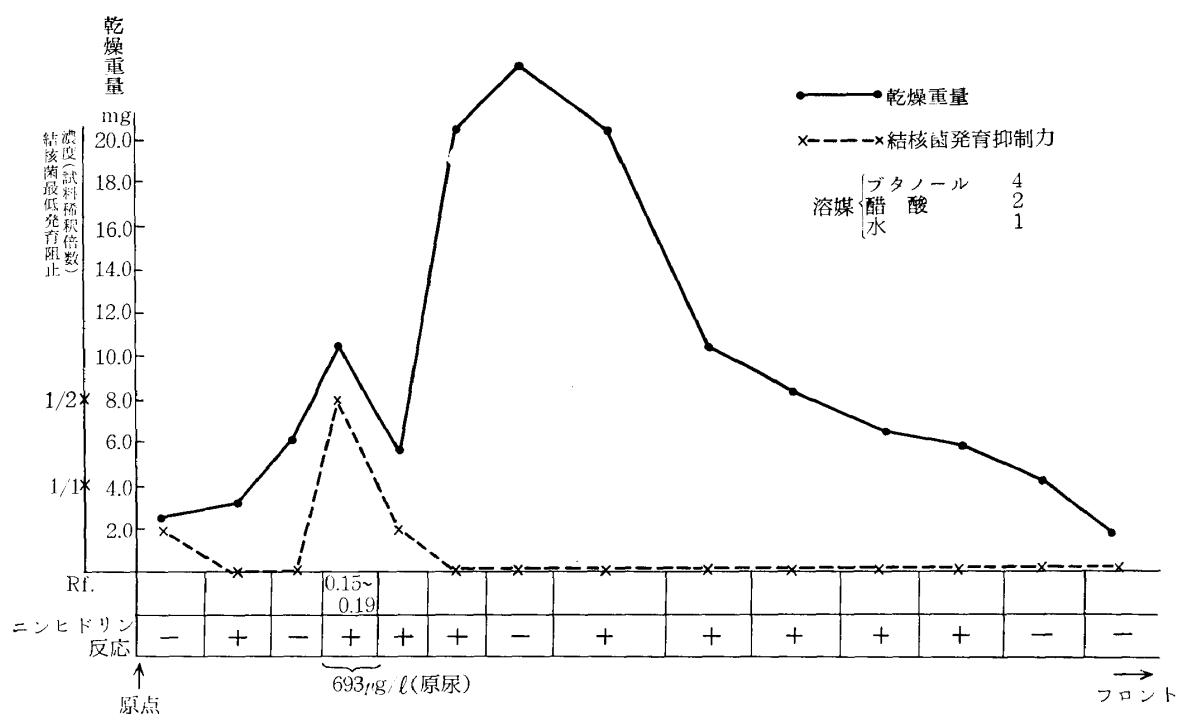
部は殆んど抗菌活性を示さなかった。このメタノール抽出材料の収量は原尿 1,000cc 当り約 30 mg であり、その結核菌に対する抗菌活性は第 I 分画と比較して約 4 倍の上昇が認められた。以上の如き実験成績に基き逐次作成したメタノール抽出材料を一旦乾固した状態で保存集積し、以下に述べる様な実験の材料とした。

材料の集積が終ると、これを用いて Dowex 50W×8 によるカラムクロマトグラフィーを行った。その実験成績は第 1 図に示す通りであった。即ちニンヒドリン定量曲線と紫外線吸収曲線と抗菌活性の曲線は何れも夫々の曲線の峰や谷がお互いに一致していなかった。これは試験材料中に多数の物質が混在していることを表わしていると同時に、抗菌性物質の検索に当たって、ニンヒドリン反応や紫外線吸収の曲線を目標として抗菌性物質の所在を推定することが不

材 料：1.6g
 カラム：Dowex 50W×8 (2×35cm)
 溶出液：1.5N 塩酸 2400cc+4.0N 塩酸 600cc



第1図 メタノール抽出材料のカラムクロマトグラフィー



第2図 分画Aのペーパークロマトグラフィーの成績

可能なことを示していた。従って甚だ煩雑ではあったが、我々はフラクションコレクターにより採集した各試験管の一本ずつに就て“Slide Culture 法”による結核菌発育抑制実験を行っ

て、目的とする抗菌性分画を発見する他はなかった。その抗菌試験の結果、第1図の鎖線によって示した様な抗菌活性の分布曲線を得たが、この分布曲線を毎回のカラムクロマトグラフィー

一の度毎に作成してみた所、常にその成績は安定していることが判明した。従って以後は各抗菌性分画に就て疑わしい数本の試験管のみを試験すればよいことが判った。

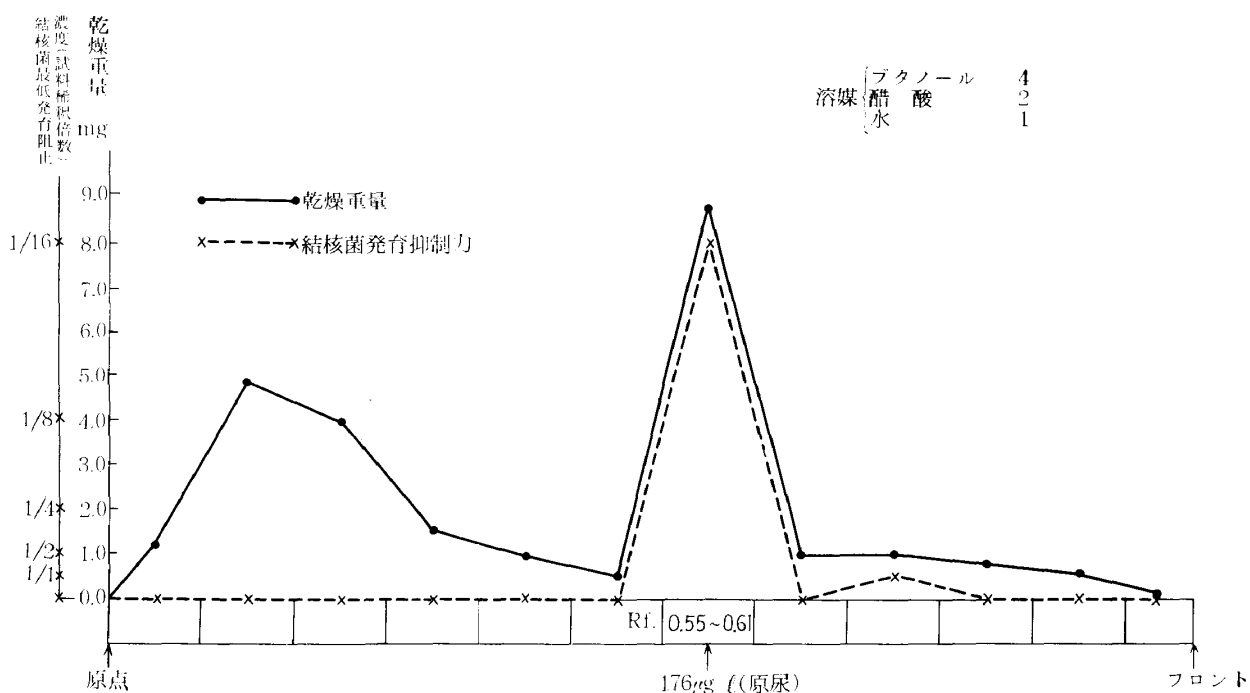
この様にして採集した抗結核菌性分画は第1図に示す如くA, B, D及びEの4分画であった。抗菌性分画A, B及びEは比較的活性が高いのに対し、分画Dの活性は低かった。そこで活性の高い分画A, B及びEに就て抗菌性物質の単離を試みた。

分画Aに就てペーパークロマトグラフィーを行い、種々の化学反応を濾紙上で行ってその組成を試験した結果、尚数種類の而も多量の不純物の混在を確認することが出来た。そこで実験方法の項に記載した様な方法で試料を濾紙上に展開した後、展開した物質の分離抽出を行い、それら各試料に就て抗菌試験を指標として活性物質を探索した。その結果第2図に示す如く、抗結核菌性物質はRf 0.2 附近に位置し、ニンヒドリン反応陽性であることが判明した。写真1はこの部分より得た結晶性物質を示す。結核菌に対する最低発育阻止濃度は $30\sim 60\mu\text{g}/\text{cc}$ であり、収量は原尿 1,000cc より $693\mu\text{g}$ であった。6 規定塩酸15時間加水分解後、数個のニン

ヒドリン反応陽性物質を生ずる点よりペプチドと推定している。

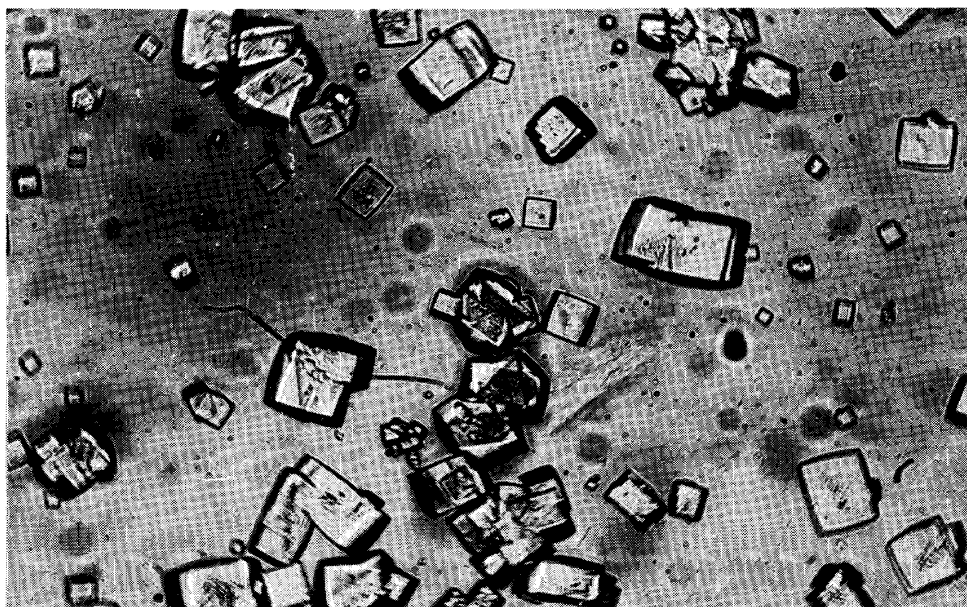
分画Bは、分画Aと同様種々検討の結果少量の不純物を含むことが判明したので上述と同様ペーパークロマトグラフィーの手技を応用し、実験方法の項に記載した如く単離実験を行った。実験成績は第3図に示す如くRf0.6 附近より抗結核菌性を有する結晶性物質の分離に成功した(写真2)。本物質はニンヒドリン反応陰性であるが、第4図に示す如く6 規定塩酸15時間加水分解後にはニンヒドリン反応陽性となる。第5図に示す如く加水分解後試料をブタノール・醋酸・水(4:2:1)と水飽和フェノールによる二次元ペーパークロマトグラフィーで展開すると4~5個のニンヒドリン反応陽性のスポットの発生を認めた。以上の点よりこの物質を分画Aの場合と同様ペプチドと推定した。この物質は原尿 1,000cc より $176\mu\text{g}$ の収量があり、結核菌に対する最低発育阻止濃度は $30\sim 60\mu\text{g}/\text{cc}$ であった。この物質は加水分解後は殆んどその抗菌活性を消失した。

分画Eは分画Aや分画Bと比較して最も抗菌活性が著明な分画であった。この分画は他の抗菌性分画よりも更に多量の不純物の混在を認め

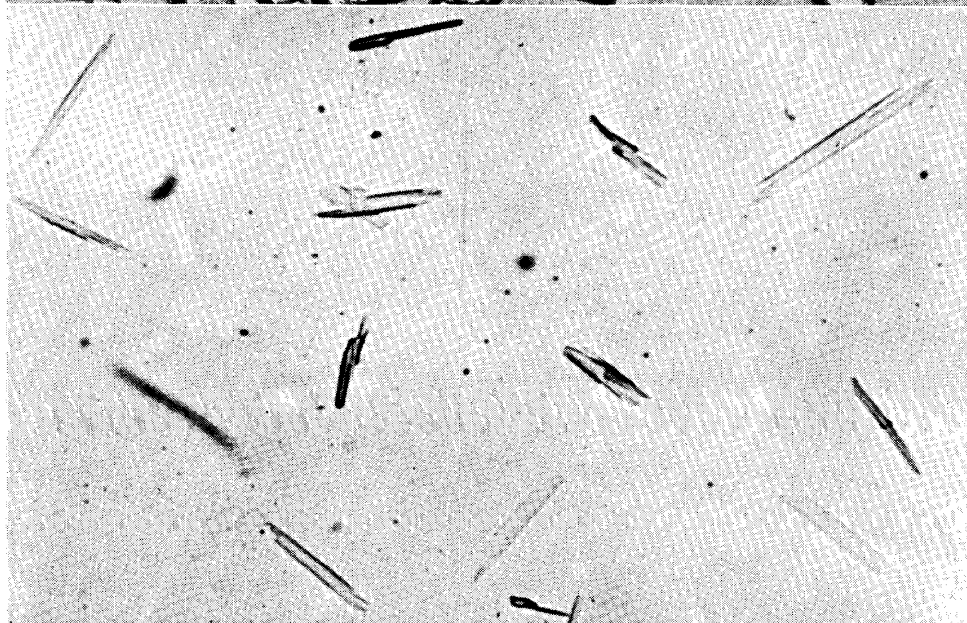


第3図 分画Bのペーパークロマトグラフィーの成績

写
真
(1)

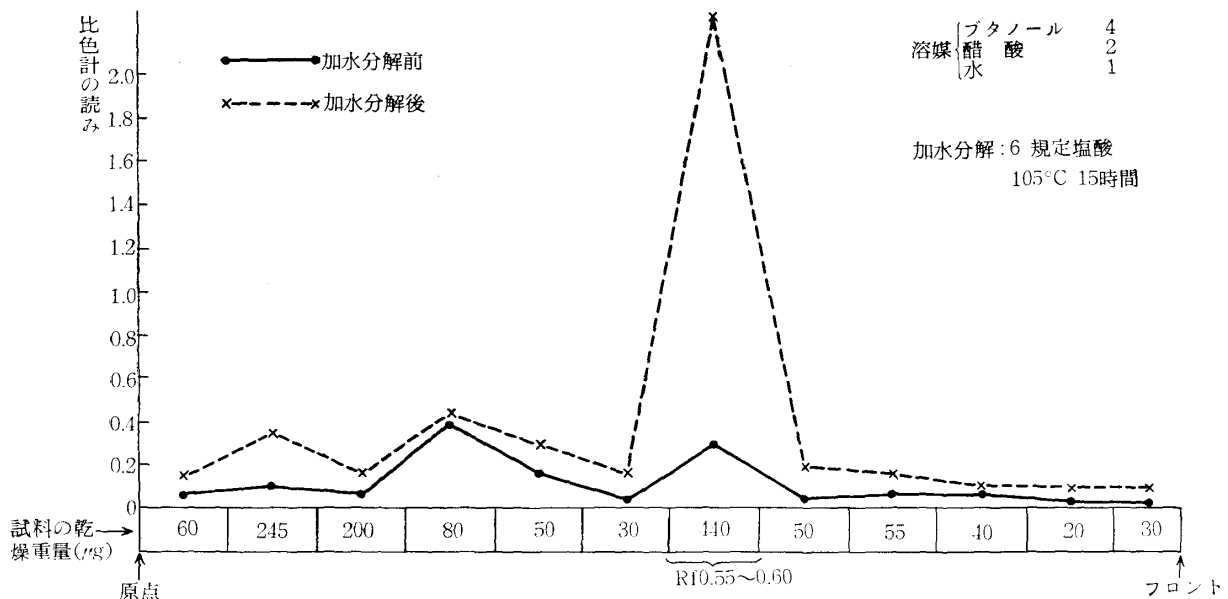


写
真
(2)



写
真
(3)





第 4 図 抗菌性物質Bの加水分解前後のニンヒドリン反応

たので精製操作を次の如く行った。先ず多量のメタノールに溶解し、これを真空デシケーター中で極めて少量となる迄濃縮し、析出した結晶性物質について前記2分画の場合と同様ペーパークロマトグラフィーによる活性物質の単離を試みた。尚結晶性物質を分離した上清部にもかなり著明な抗結核菌作用を認めたが、現在の段階ではこの本体と思われる物質の単離には成功していない。

結晶性物質のペーパークロマトグラフィーの実験成績は第6図に示す如く尚若干の不純物の混在を認めた。しかし著明な抗結核菌作用はRf0.33附近にのみ証明されたので、この抗結核菌性物質の単離を行った。この物質は紫外線照射により蛍光を発し、ニンヒドリン反応弱陽性であった。結核菌に対する最低発育阻止濃度は $10\sim 20\mu\text{g}/\text{cc}$ であり、原尿1,000ccより約 $7\mu\text{g}$ の収量があった。

以上3種類の抗結核菌性物質に就てはアミノ酸組成、元素分析及び分子量測定を行う為実験材料を集積中である。その他の抗菌性物質に関しても化学的同定実験を遂行中である。

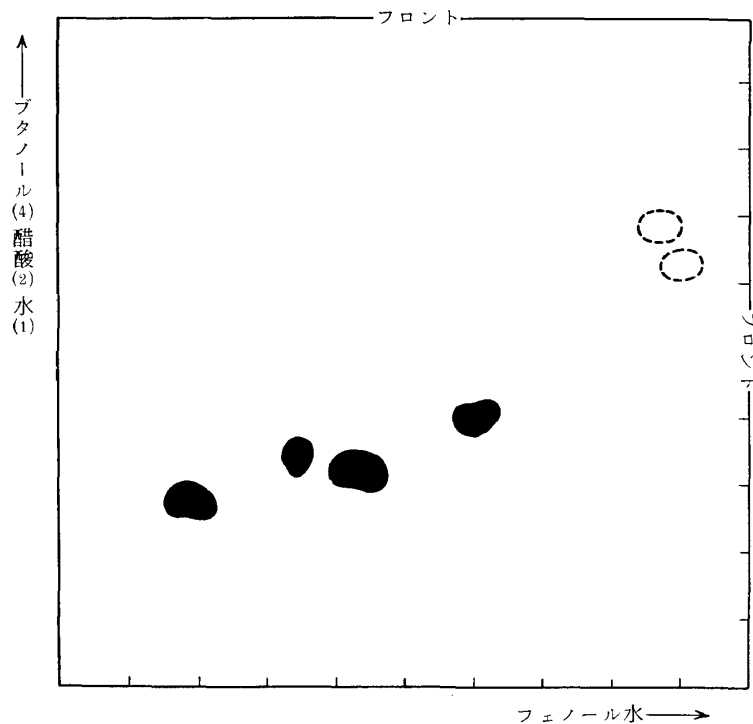
考 按

健康人尿が結核菌に対し発育抑制的に作用す

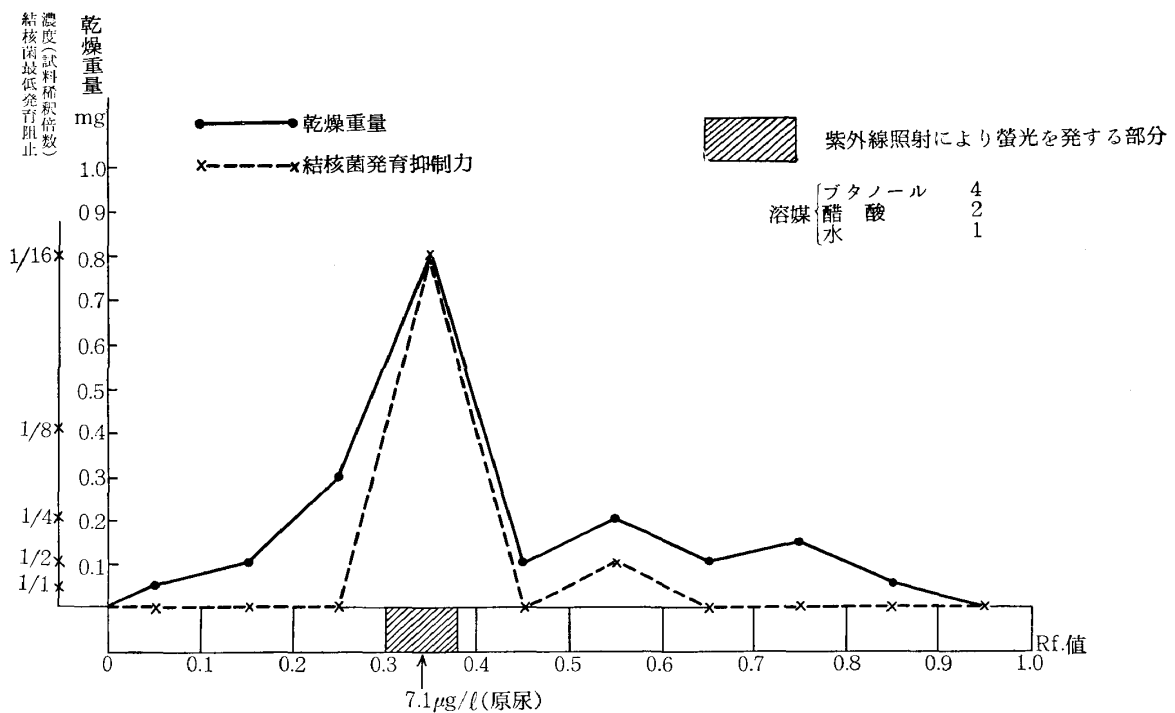
ることを始めて *in vitro* の実験で証明したのは Dold⁶⁾ であった。彼は尿中の抗菌因子の本体は尿素に由来するシアン化合物であると考えた。続いて Björnesjo⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾ は尿中の抗結核菌性因子に就て系統的研究を行い、健康人尿中の活性因子は不揮発性で、セロファン膜を容易に通過し、電気透析により陽極側に移動し、メタノール及びエタノールを除く多くの有機溶媒に不溶性であり、pH 酸性側で著しい抗菌活性を示し、活性炭に吸着される等の多くの性質に就て報告したが、その活性因子の本体を明かにすることは出来なかった。

Myrvik and Weiser¹²⁾ は Björnesjo の報告した抗菌因子の諸性質よりその本体はアスコルビン酸或はその誘導体ではないかという想定の下に人間にアスコルビン酸を投与し、その尿の抗結核菌作用が著明に増加したという実験成績を報告した。しかし Björnesjo¹³⁾ はこの Myrvik らの想定に反対し、抗菌因子のメタノール溶解性がアスコルビン酸のそれと異なる点を挙げて反論している。

本邦に於ては森田¹⁴⁾ が健康人尿中の抗結核菌性因子に就て Björnesjo と略同様の実験成績を報告しているが、彼も抗菌因子の本体を明



第5図 Fr.B のペーパー展開，抽出より得られた抗菌性物質の
水解後二次元ペーパークロマトグラフィー



第6図 分割E中のペーパークロマトグラフィーの成績

かにし得なかった。著者ら¹⁾²⁾³⁾は緒論に於て述べた如く，結核に対する生体の防衛機序に関する系統的研究の途上，偶々体液低分子成分中に著明な結核菌発育抑制作用を有する物質の存在することを知った。そこで結核に対する生体

の自然低抗力に関連してこの物質が果す役割を研究する目的で，容易に多量の材料を得ることが出来るという利点から健康人尿を実験材料としてこの物質の化学的同定を目標とした実験を進めた。即ち大島¹⁵⁾はイオン交換樹脂による

系統的分画の結果、尿の抗菌因子には両性物質と酸性物質の2種類の物質が存在することを発見し、従来の一元的な考え方に対して新しい視野を開いた。

今回著者らは本実験成績の示す如く、健康人尿第I分画より3種の抗結核菌性物質(A, B及びE)の単離に成功した。その化学組成については今後の研究結果を俟って報告する予定であるが、恐らくA及びBは芳香族ペプチドに属する物質ではないかと推定している。生体材料より分離した抗結核菌性ペプチドに関する報告としてはDubos and Hirsch^{16), 17)}による“Thymus Peptide”がある。彼等は仔牛の胸腺より結核菌発育抑制作用を有する塩基性ペプチドを分離することに成功したが、そのペプチドのH37Rv菌に対する完全発育阻止濃度は300 μ g/ccに過ぎなかった。又そのアミノ酸組成は複雑であり、かなり高分子のペプチドであると思われた。一方著者らの単離したペプチドは“Thymus Peptide”と比較して抗菌活性は著しく強大である。

既に著者らの報告した体液低分子成分の抗結核菌作用の本態の一部に之等の強力な抗菌性ペプチドが関与していることは明かであり、結核菌に対する生体の自然抵抗力の説明に有力な根拠を与えるものであろう。但しここに重大な問題が残されている。それは果して著者らの分離した3種類の物質(A, B及びE)がそのままの形で人尿に存在していたのであろうかという点である。或は複雑な精製操作過程に於て、より高分子のペプチドの部分的加水分解による変性物質と考えるべきであらうか? Ansorge¹⁸⁾は健康人尿中のペプチドに就てペーパークロマトグラフィーによる分離同定実験を行い、20種類のペプチドに就てそのアミノ酸組成を報告したが、著者らの分離したペプチドに相当する様な少数種類のアミノ酸より成るペプチドに就ての報告は無い。従って我々の分離した物質が精製操作の産物であり、自然界にはより複雑な物質として存在している可能性は否定出来ない。この点に関しては尚今後の検討を要するものと考ええる。ともあれ、健康人

尿中より抗菌性のペプチド様物質を結晶形で単離し得たことは我々の実験を以て矯失とすると考え、ここにその精製操作に就て報告した次第である。

要 約

健康人尿の両性物質を含む分画(分画I)を実験材料として抗結核菌性因子の分離精製を行った。

1) 第I分画の活性炭カラム及びメタノールによる精製操作により約4倍の抗菌活性の上昇を認めた。

2) この材料を更に陽イオン交換樹脂によるカラムクロマトグラフィーによって分画し、4つの抗結核菌性分画(A, B, D及びE)を得た。

3) その内3つの抗結核菌性分画(A, B及びE)よりペーパークロマトグラフィーの手法を応用して3種類の抗菌性物質の単離に成功した。

4) 単離した抗結核菌性物質A及びBは何れもペプチドと推定された。特に分画Bから分離した抗菌性物質はニンヒドリン反応陰性のペプチドと思われる。抗菌性物質Eに関しては目下検討中である。

本研究に対し、文部省科学研究費(試験研究)及びアメリカ合衆国 National Institutes of Health よりの研究費(E-4252)の御援助を頂いた。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) 辻周介他4名：結核に対する生体の防衛力に関する研究(第2報)自然抵抗力における液性因子の意義, 最新医学, 11, 1236, (昭31)
- 2) 辻周介他2名：結核に対する生体の防衛力に関する研究(第3報)獲得性抵抗力としての体液及び血清の結核菌発育阻止現象, 最新医学, 11, 1400 (昭31)
- 3) 辻周介他4名：結核に対する生体の防衛力に関する研究(第5報)結核に対する自然抵抗力及び獲得性抵抗力に於ける液性因子の化学的分析, 最新医学, 14, 2340 (昭34)
- 4) Jutisz, M. and Lederer, E. : Quantitative

- chromatographic separations of synthetic peptides; *Nature*, **159**, 445 (1947)
- 5) Tsuji, S., Yamamoto, H. and Ito, K.: An improvement of the slide culture method, *Japan. J. Tuberc.*, **2**, 238 (1954)
 - 6) Dold, H.: Nachweis tuberkelbazillenfeindlicher Stoffe im normalen Menschen Harn und Untersuchungen über die Natur dieser Stoffe, *Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten*, **127**, 304 (1947)
 - 7) Björnesjo, K.B.: On the effect of human urine on tubercle bacilli, *Acta Tuberc. Scandinav.*, **25**, 425 (1951)
 - 8) Björnesjo, K.B.: On the effect of human urine on tubercle bacilli, II The tuberculostatic effect of various urine constituents, *Acta Tuberc. Scandinav.*, **25**, 447 (1951)
 - 9) Björnesjo, K.B.: On the effect of human urine on tubercle bacilli, III The solubility of the tuberculostatic factor in organic solvents, and its behavior in dialysis and electrodialysis, *Acta Tuberc. Scandinav.*, **25**, 457 (1951)
 - 10) Björnesjo, K.B.: On the effect of human urine on tubercle bacilli, IV Some attempts to concentrate and purify the tuberculostatic factor, *Acta Tuberc. Scandinav.*, **27**, 116 (1952)
 - 11) Björnesjo, K.B.: On the effect of human urine on tubercle bacilli, V. Experiments with the tuberculostatic factor purified from urine, *Acta Tuberc. Scandinav.*, **27**, 123 (1952)
 - 12) Myrvik, Q.N. and Weiser, R.S.: Studies on the tuberculoinhibitory properties of ascorbic acid derivatives and their possible role in inhibition of tubercle bacilli by urine, *Am. Rev. Tuberc.*, **69**, 406 (1954)
 - 13) Björnesjo, K.B.: Tuberculostatic factor in normal human urine, *Am. Rev. Tuberc.*, **73**, 967 (1956)
 - 14) 森田満寿治: 人尿中の結核菌発育阻止物質に就て, *産婦人科の進歩*, **6**, 335 (昭29)
 - 15) 大島駿作: 人尿に於ける抗結核菌性因子の研究, *京大結研紀要*, **7** (2), 75 (昭34)
 - 16) Dubos, R.J. and Hirsch, J.G.: Antimycobacterial activity of a peptide preparation derived from calf thymus, *J. Exp. Med.*, **99**, 55 (1954)
 - 17) Hirsch, J.G. and Dubos, R.J.: Chemical studies on a basic peptide preparation derived from calf thymus, *J. Exp. Med.*, **99**, 65 (1954)
 - 18) Ansorge, S., Fittkau, S. und Hanson, H.: Vergleichende Untersuchungen über die Ausscheidung von Peptiden im Harn stoffwechselgesunder Personen, *Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. Physiol. Chemie*, **324**, 17 (1961)